

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-157598
(P2001-157598A)

(43) 公開日 平成13年6月12日 (2001. 6. 12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/543	5 2 1
33/543	5 2 1	33/566	
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-342654

(22) 出願日 平成11年12月1日 (1999. 12. 1)

(71) 出願人 000003821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 中山 浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子検出方法およびその方法を利用した装置

(57) 【要約】

【課題】 細胞、ウイルスまたは細菌を簡便に、かつ高い選択性をもって検出できる遺伝子検出方法、およびその方法に好適な装置を提供すること

【解決手段】 細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出する工程、任意に抽出された遺伝子を断片化する工程、および、遺伝子またはその断片を検出する工程を包含する、遺伝子検出方法。この方法において、抽出工程、任意の断片化工程、および検出工程は、単一の遺伝子検出装置上で、遺伝子またはその断片を含む液体試料をキャピラリー作用によって移動させることにより連続して行われ得る。細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出するための領域、任意に抽出された遺伝子を断片化するための領域、および遺伝子またはその断片を検出するための領域を備えた、遺伝子検出装置。この装置は、遺伝子またはその断片を含む液体試料を、該抽出領域、任意の断片化領域、および検出領域を通じて、キャピラリー作用によって移動させ得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出する工程、任意に抽出された遺伝子を断片化する工程、および、該遺伝子またはその断片を検出する工程を包含する、遺伝子検出方法であって、該抽出工程、任意の断片化工程、および検出工程が、単一の遺伝子検出装置上で、該遺伝子またはその断片を含む液体試料をキャピラリー作用によって移動させることにより連続して行われる、遺伝子検出方法。

【請求項2】 前記細菌が、以下の分類のいずれかに属する、請求項1に記載の遺伝子検出方法：ロドスピリウム、クロマチア、クロロビウム、ミクソコッカス、アルカンギウム、シストバクター、ポリアンギウム、サイトファーガ、ベギアトア、シモンシエラ、リューコトリックス、アクロマチウム、ペロネーマ、スピロヘータ、スピリウム、シュードモナス、アゾバクター、リゾビウム、メチロモナス、ハロバクテリウム、腸内細菌、ヴィブリオ、バクテロイデス、ナイセリア、ヴェイヨネラ、アンモニアまたは亜硝酸化細菌、硫黄代謝細菌、酸化鉄および／または酸化マンガン沈着細菌、シデロカプサ、メタノバクテリウム、好気性または通性嫌気性ミクロコッカス、ストレプトコッカス、嫌気性ペプトコッカス、バチルス、乳酸桿菌、コリネフォルム細菌、プロピオン酸菌、アクチノミセス、マイコバクテリウム、フランキア、アクチノプレーネス、デルマトフィルス、ノカルディア、ストレプトミセス、ミクロモノスポラ、リケッチア、バルトネラ、アナプラズマ、クラミディア、マイコプラズマ、およびアコレプラズマ。

【請求項3】 前記ウイルスが、以下の分類のいずれかに属する、請求項1に記載の遺伝子検出方法：エンテロウイルス、カルディオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、カリシウイルス、ヘパトウイルス、オルビウイルス、レオウイルス、ロタウイルス、アピビルナウイルス、ピスチビルナウイルス、エントモビルナウイルス、アルファウイルス、ルビウイルス、ベスティウイルス、フラヴィウイルス、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ニューモウイルス、パラミクソウイルス、モルビリウイルス、ベシクロウイルス、リッサウイルス、コロナウイルス、ブンヤウイルス、アレナウイルス、レンチウイルス、オルトヘパドナウイルス、マストアデノウイルス、リンホクリプトウイルス、ロゼオロウイルス、サイトメガロウイルス、ワリセラウイルス、およびシンプレックスウイルス。

【請求項4】 細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出するための領域、任意に抽出された遺伝子を断片化するための領域、および該遺伝子またはその断片を検出するための領域を備えた、遺伝子検出装置であって、該遺伝子またはその断片を含む液体試料を、該抽出領域、任意の断片化領域、および検出領域を通じて、キャピラリー作用によって移動させ得る、遺伝子検出装置。

【請求項5】 前記抽出領域が、細胞、ウイルスまたは細菌の、電気的処理または化学的処理を行うための構成を有する、請求項4に記載の遺伝子検出装置。

【請求項6】 前記電気的処理が、電圧を細胞、ウイルスまたは細菌にかけることにより遺伝子を遊離させる処理である、請求項5に記載の遺伝子検出装置。

【請求項7】 前記化学的処理が、酵素、界面活性剤、カオトロピック試薬、金属キレート剤、還元剤、および有機溶媒、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される変性試薬を、細胞、ウイルスまたは細菌に接触させることにより遺伝子を遊離させる処理である、請求項5に記載の遺伝子検出装置。

【請求項8】 前記断片化領域が、抽出された遺伝子の、制限酵素処理または酸もしくはアルカリでの化学的処理を行うための構成を有する、請求項4に記載の遺伝子検出装置。

【請求項9】 前記検出領域が、前記遺伝子またはその断片の、抗遺伝子抗体との反応および／または相補的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを行うための構成を有する、請求項4に記載の遺伝子検出装置。

【請求項10】 前記抗遺伝子抗体との反応を、免疫クロマトグラフィー法、免疫比濁法、免疫ひろう法、ラテックス免疫比濁法、ラテックス免疫ひろう法または蛍光偏光免疫測定法を用いて検出するための構成を有する、請求項9に記載の遺伝子検出装置。

【請求項11】 前記ハイブリダイゼーションを、遺伝子クロマトグラフィー法、遺伝子比濁法、または遺伝子ひろう法を用いて検出するための構成を有する、請求項9に記載の遺伝子検出装置。

【請求項12】 細胞、ウイルスまたは細菌の同定に有用な遺伝子検出装置であって、以下の領域：細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出するための領域であって、電圧を細胞、ウイルスまたは細菌にかけることにより遺伝子を遊離させる電気的処理を行うための構成を有する領域；抽出された遺伝子を断片化するための領域であって、該抽出遺伝子の制限酵素処理を行うための構成を有する領域；および該遺伝子の断片を検出するための領域であって、標識部分を結合させた相補的ポリヌクレオチドまたは抗遺伝子抗体を有するサブ領域、および多孔質膜上に固定化された相補的ポリヌクレオチドを有するサブ領域を含む、領域を備え、

該遺伝子またはその断片を含む液体試料を、該抽出領域、断片化領域、および検出領域を通じて、キャピラリー作用によって移動させ得る、遺伝子検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞、ウイルスまたは細菌を遺伝子レベルで検出するための方法および装置に関する。本発明は、特に、環境、食品および医療の分野において有用である。

【0002】

【従来の技術】従来、細胞、ウイルスまたは細菌の検出法の例として、これらの測定対象物に結合する二種類以上の抗体を備えた免疫クロマトグラフィー・デバイスを用いて、測定対象物をサンドイッチ状に捕捉する方法がある。この方法では、標識物として色素または酵素を用い、色素の呈色または酵素反応による可視化を利用して、捕捉された測定対象物について判定していた。

【0003】他の検出法の例としては、細胞、ウイルスまたは細菌から有機溶剤などを利用して抽出した遺伝子を、PCRにより増幅する方法がある。この方法では、測定対象物由来の遺伝子に相補的に結合するプローブを蛍光色素などで標識したものを、PCR増幅された産物と混合し、得られた結合体からの蛍光を検出することにより、測定対象物の存在を検出していた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上述のような、従来の免疫クロマトグラフィー・デバイスは、細胞、ウイルスまたは細菌の表面にある抗原性物質（表面抗原）を検出するものであるが、その検出の特異性に課題があった。例えば、一種類の細菌を選択的に検出することが意図されているにもかかわらず、デバイス上の抗体が交差反応を起こして他種の細菌を補足する場合があります、誤動作の原因となっていた。

【0005】他方、細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出して、その遺伝子の塩基配列情報に基づいて測定対象物の存在を判断する方法においては、遺伝子抽出およびPCR増幅を含む一連の操作、特にタンパク質除去の段階の溶液のハンドリングが煩雑であるという課題があった。

【0006】本発明は上記の問題点を解決するためのものであり、その目的とするところは、細胞、ウイルスまたは細菌を簡便に、かつ高い選択性をもって検出できる遺伝子検出方法、およびその方法に好適な装置を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出する工程、任意に抽出された遺伝子を断片化する工程、および、該遺伝子またはその断片を検出する工程を包含する、遺伝子検出方法であって、該抽出工程、任意の断片化工程、および検出工程が、単一の遺伝子検出装置上で、該遺伝子またはその断片を含む液体試料をキャピラリー作用によって移動させることにより連続して行われる、遺伝子検出方法を提供する。

【0008】上記遺伝子検出方法において、上記細菌は、以下の分類のいずれかに属し得る：ロドスピリウム、クロマチア、クロロビウム、ミクソコッカス、アルカンギウム、シストバクター、ボリアンギウム、サイトファーガ、ベギアトア、シモンシエラ、リューコトリッ

クス、アクロマチウム、ペロネーマ、スピロヘータ、スピリウム、シュードモナス、アゾトバクター、リゾビウム、メチロモナス、ハロバクテリウム、腸内細菌、ヴィブリオ、バクテロイデス、ナイセリア、ヴェイヨネラ、アンモニアまたは亜硝酸化細菌、硫黄代謝細菌、酸化鉄および/または酸化マンガン沈着細菌、シデロカプサ、メタノバクテリウム、好気性または通性嫌気性ミクロコッカス、ストレプトコッカス、嫌気性ペプトコッカス、バチルス、乳酸桿菌、コリネフォルム細菌、プロピオン酸菌、アクチノミセス、マイコバクテリウム、フランキア、アクチノプレーネス、デルマトフィルス、ノカルディア、ストレプトミセス、ミクロモノスポラ、リケッチア、バルトネラ、アナプラズマ、クラミディア、マイコプラズマ、およびアコレプラズマ。

【0009】上記遺伝子検出方法において、上記ウイルスは、以下の分類のいずれかに属し得る：エンテロウイルス、カルディオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、カリシウイルス、ヘパトウイルス、オルビウイルス、レオウイルス、ロタウイルス、アビビルナウイルス、ピスチビルナウイルス、エントモビルナウイルス、アルファウイルス、ルビウイルス、ベスティウイルス、フラヴィウイルス、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ニューモウイルス、パラミクソウイルス、モルビリウイルス、ベシクロウイルス、リッサウイルス、コロナウイルス、ブンヤウイルス、アレナウイルス、レンチウイルス、オルトヘパドナウイルス、マストアデノウイルス、リンホクリプトウイルス、ロゼオロウイルス、サイトメガロウイルス、ワリセラウイルス、およびシンプレックスウイルス。

【0010】本発明はまた、細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出するための領域、任意に抽出された遺伝子を断片化するための領域、および該遺伝子またはその断片を検出するための領域を備えた、遺伝子検出装置であって、該遺伝子またはその断片を含む液体試料を、該抽出領域、任意の断片化領域、および検出領域を通じて、キャピラリー作用によって移動させ得る、遺伝子検出装置を提供する。

【0011】上記抽出領域は、細胞、ウイルスまたは細菌の、電気的処理または化学的処理を行うための構成を有し得る。電気的処理は、電圧を細胞、ウイルスまたは細菌にかけることにより遺伝子を遊離させる処理であり得る。化学的処理は、酵素、界面活性剤、カオトロピック試薬、金属キレート剤、還元剤、および有機溶媒、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される変性試薬を、細胞、ウイルスまたは細菌に接触させることにより遺伝子を遊離させる処理であり得る。

【0012】上記断片化領域は、抽出された遺伝子の、制限酵素処理または酸もしくはアルカリでの化学的処理を行うための構成を有し得る。

【0013】上記検出領域は、上記遺伝子またはその断

片の、抗遺伝子抗体との反応および／または相補的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを行うための構成を有し得る。抗遺伝子抗体との反応は、免疫クロマトグラフィー法、免疫比濁法、免疫ひろう法、ラテックス免疫比濁法、ラテックス免疫ひろう法または蛍光偏光免疫測定法を用いて検出され得る。ハイブリダイゼーションは、遺伝子クロマトグラフィー法、遺伝子比濁法、または遺伝子ひろう法を用いて検出され得る。

【0014】本発明は、好適な実施態様において、細胞、ウイルスまたは細菌の同定に有用な遺伝子検出装置であって、以下の領域：細胞、ウイルスまたは細菌から遺伝子を抽出するための領域であって、電圧を細胞、ウイルスまたは細菌にかけることにより遺伝子を遊離させる電気的処理を行うための構成を有する領域；抽出された遺伝子を断片化するための領域であって、該抽出遺伝子の制限酵素処理を行うための構成を有する領域；および、該遺伝子の断片を検出するための領域であって、標識部分を結合させた相補的ポリヌクレオチドまたは抗遺伝子抗体を有するサブ領域、および多孔質膜上に固定化された相補的ポリヌクレオチドを有するサブ領域を含む領域を備え、該遺伝子またはその断片を含む液体試料を、該抽出領域、断片化領域、および検出領域を通じて、キャピラリー作用によって移動させ得る、遺伝子検出装置を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本願発明を詳しく説明する。

【0016】（遺伝子検出方法の対象）本発明は、細胞、ウイルスまたは細菌からの遺伝子の検出に関する。本明細書において、「細胞」とは、真核細胞をいう。「ウイルス」とは、核酸（DNAまたはRNA）がタンパク質に包まれた、いわゆるビリオンを構成する感染性の構造体をいう。「細菌」とは、原核細胞である単細胞の微小生物をいう。本発明によれば、特定のタイプの細胞、ウイルスまたは細菌（以下、総称して「測定対象物」ともいう）を含むことが疑われる試料を分析して、当該測定対象物を特徴づける遺伝子（以下「目的遺伝子ともいう」）の存否を判断し、さらにその種類を同定することが可能になる。

【0017】本発明において意図される試料は、医療診断、環境測定、および食品管理を含む任意の分野における、分析が所望される測定対象物を含む材料である。医療診断用の試料の例としては、血液、リンパ液、および組織液を包含する体液が挙げられる。環境測定用の試料の例としては、土壌、河川、大気などから採取した材料が挙げられる。食品管理用の試料の例としては、ひき肉からの抽出液、まな板表面からの抽出液が挙げられる。試料は、後述する本発明の検出装置に適用し得る限り、任意の液体試料であり得、代表的には、水を溶媒または分散媒として含む任意の水性試料であり得る。

【0018】本発明において測定対象物となる細胞は特に限定されないが、その例としては、生体から採集された細胞（例えば、ほ乳動物の血液、リンパ液または組織液中の細胞、粘膜細胞など）および培養細胞（例えば、酵母、昆虫、植物、動物などの培養細胞）が挙げられる。より具体的な例としては、疾病に罹患したか、もしくは罹患が疑われる被験体、または疾病モデル動物から採集された細胞であって、当該疾病に特有の表現型を有する細胞などが挙げられる。

【0019】本発明において測定対象物となるウイルスは特に限定されず、任意の細菌ウイルス、植物ウイルス、および動物ウイルスを含む。その例としては、以下の分類のいずれかに属するウイルスが挙げられる：Enterovirus（エンテロウイルス）、Cardiovirus（カルディオウイルス）、Rhinovirus（ライノウイルス）、Aphthovirus（アフトウイルス）、Calicivirus（カリシウイルス）、Hepatovirus（ヘパトウイルス）、Orbivirus（オルビウイルス）、Reovirus（レオウイルス）、Rotavirus（ロタウイルス）、Abibirnavirus（アビビルナウイルス）、Piscibirnavirus（ピスチビルナウイルス）、Entomobirnavirus（エントモビルナウイルス）、Alphavirus（アルファウイルス）、Rubivirus（ルビウイルス）、Pestivirus（ペスティウイルス）、Flavivirus（フラヴィウイルス）、Hepatitis C virus（C型肝炎ウイルス）、Influenzavirus（インフルエンザウイルス）、Pneumovirus（ニューモウイルス）、Paramyxovirus（パラミクソウイルス）、Morbillivirus（モルビリウイルス）、Vesiculovirus（ベシクロウイルス）、Lyssavirus（リッサウイルス）、Coronavirus（コロナウイルス）、Bunyavirus（ブンヤウイルス）、Arenavirus（アレナウイルス）、Lentivirus（レンチウイルス）、Orthohepadnavirus（オルトヘパドナウイルス）、Mastadenovirus（マストアダノウイルス）、Lymphocryptovirus（リンホクリプトウイルス）、Roseolovirus（ロゼオロウイルス）、Cytomegalovirus（サイトメガロウイルス）、Varicellavirus（ワリセラウイルス）、およびSimplexvirus（シンプレックスウイルス）。

【0020】測定対象ウイルスとして、カリシウイルス、ヘパトウイルス、オルトヘパドナウイルス、エンテロウイルス、ロタウイルス、マストアダノウイルス、レンチウイルス、およびC型肝炎ウイルスが重要であり得、特に、カリシウイルスに属するSmall Rou

nd Structured Virus (SRV; 小型球形ウイルス)、ヘパトウイルスに属するA型肝炎ウイルス、オルトヘパドナウイルスに属するB型肝炎ウイルス、ならびに、レンチウイルスに属するヒト免疫不全ウイルスI (エイズウイルス)、およびC型肝炎ウイルスが重要であり得る。

【0021】本発明において測定対象物となる細菌の例としては、以下の分類のいずれかに属する細菌が挙げられる: Rhodospirillaceae (ロドスピリルム)、Chromatiaceae (クロマチウム)、Chlorobiaceae (クロロビウム)、Myxococcaceae (ミクソコッカス)、Archangiaceae (アルカンギウム)、Cystobacteraceae (シストバクター)、Polynangiaceae (ポリアンギウム)、Cytophagaceae (サイトファーガ)、Beggiatoaceae (ベギアトア)、Simonsiellaceae (シモンシエラ)、Leucotrichaceae (リュウコトリックス)、Achromatiaceae (アクロマチウム)、Pelonemataceae (ペロネマ)、Spirochaetaceae (スピロヘータ)、Spirillaceae (スピリルム)、Pseudomonadaceae (シュードモナス)、Azotobacteraceae (アゾトバクター)、Rhizobiaceae (リゾビウム)、Methylobacteriaceae (メチロモナス)、Halobacteriaceae (ハロバクテリウム)、Enterobacteriaceae (腸内細菌)、Vibrionaceae (ヴィブリオ)、Bacteroidaceae (バクテロイデス)、Neisseriaceae (ナイセリア)、Veillonellaceae (ヴェイヨネラ)、アンモニアまたは亜硝酸化細菌 (Organisms oxidizing ammonia or nitrite)、硫黄代謝細菌 (Organisms metabolizing sulfur and sulfur compounds)、酸化鉄および/または酸化マンガン沈着細菌 (Organisms depositing iron and/or manganese oxides)、Siderocapsaceae (シデロカプサ)、Methanobacteriaceae (メタノバクテリウム)、好気性または通性嫌気性 (Aerobic or facultatively anaerobic)、Micrococcaceae (ミクロコッカス)、Streptococcaceae (ストレプトコッカス)、嫌気性 (Anaerobic)、Peptococcaceae (ペプトコッカス)、Bacillaceae (バチルス)、Lactobacillaceae (乳酸桿菌)、コリネフォルム細菌 (Coryneform group of bacteria)

acteria)、Propionibacteriaceae (プロピオン酸菌)、Actinomycetaceae (アクチノミセス)、Mycobacteriaceae (マイコバクテリウム)、Frankiaceae (フランキア)、Actinoplanaceae (アクチノプレーネス)、Dermatophilaceae (デルマトフィルス)、Nocardiaceae (ノカルディア)、Streptomycetaceae (ストレプトミセス)、Micromonosporaceae (ミクロモノスポラ)、Rickettsiaceae (リケッチア)、Bartonellaceae (バルトネラ)、Anaplasmataceae (アナプラズマ)、Chlamydiaceae (クラミディア)、Mycoplasmataceae (マイコプラズマ)、およびAcholeplasmataceae (アコレプラズマ)。

【0022】測定対象細菌として、腸内細菌およびヴィブリオが重要であり得、特に、腸内細菌に属するサルモネラおよび腸管出血性大腸菌、ならびにヴィブリオに属する腸炎ビブリオ菌が重要であり得る。

【0023】(遺伝子検出方法の実施) 本発明による遺伝子の検出方法は、遺伝子を抽出する工程と、必要に応じて抽出された遺伝子を断片化する工程と、遺伝子またはその断片を検出する工程とを含む。本発明において、代表的には、これらの工程の全てが、単一の遺伝子検出装置上で、該遺伝子またはその断片を含む液体試料をキャピラリー作用によって移動させることにより連続して行われることにより、迅速かつ簡便な遺伝子の検出が可能となる。

【0024】ここで、試料を「キャピラリー作用によって移動」させるとは、装置中の、細胞、ウイルスまたは細菌を含む液体試料が導入される固体部分(以下「試料泳動体」ともいう)であって、遺伝子を抽出するための領域、任意に抽出された遺伝子を断片化するための領域、および該遺伝子またはその断片を検出するための領域を含む部分において、液体試料を、固液界面でのキャピラリー作用によって、装置外部からの作用を要することなく、連続的に移動させることをいう。

【0025】以下、各工程ごとに説明する。

【0026】(抽出工程) 本発明において、遺伝子の「抽出」とは、細胞、ウイルスまたは細菌の内部に存在する遺伝子を、その構成体の細胞膜または被包タンパク質の構造を破壊または変性させることによって、外部に遊離させることをいう。抽出の工程は、具体的には、細胞、ウイルスまたは細菌を電氣的処理または化学的処理に付すことで達成され得る。

【0027】上記抽出のための「電氣的処理」とは、細胞膜または被包タンパク質の構造の破壊または変性を生じさせるに十分で、かつ内部の遺伝子は著しく損傷することのない範囲の電圧(電位差)を、導電媒体中に存在

する測定対象物に与えることをいう。電気的処理は、代表的には、測定対象物を水溶液中に分散した状態で行われる。適切な処理電圧は、処理領域の形状など装置の構成に応じて変動し得ることが理解される。代表的な処理電圧は、荷電電極間において、 1 V/cm 以上であり得、好ましくは 5 V/cm 以上、より好ましくは 10 V/cm 以上に設定され得る。処理電圧の上限は、通常数千V程度までである。電気的処理の時間は、目的とする遺伝子の抽出が達成される限り、特に限定されないが、代表的には1分間～60分間、好ましくは3分間～30分間、より好ましくは5分間～20分間程度の範囲で設定され得る。

【0028】上記抽出のための「化学的処理」とは、細胞膜または被包タンパク質の構造の破壊または変性を生じさせるに十分で、かつ内部の遺伝子は著しく損傷することのない化学物質（本明細書において「変性物質」ともいう。）を、測定対象物に接触させることをいう。変性物質の例として、酵素、界面活性剤、カオトロピック試薬、金属キレート剤、還元剤、および有機溶媒、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。

【0029】好ましい酵素の例として、リゾチームに代表される細胞壁分解酵素、および種々のタンパク質またはペプチド分解酵素などが挙げられる。好ましい界面活性剤の例として、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、およびN-ラウリルサルコシン酸ナトリウム（サルコシル）などのカチオン性界面活性剤、ならびに、ポリオキシエチレンアルコール、およびオクリルフェノールエチレンオキシド縮合物などのノニオン性界面活性剤が挙げられる。好ましいカオトロピック試薬（タンパク質または核酸の高次構造を形成する非共有結合を切断し得る試薬）の例として、チオシアン酸グアニジウム、および尿素などが挙げられる。好ましい金属キレート剤の例として、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、およびエチレンジアミン（オキシエチレンジアミン）四酢酸（EGTA）などが挙げられる。好ましい還元剤の例として、 β -メルカプトエタノール、およびジチオスレイトール（DTT）などが挙げられる。好ましい有機溶媒の例として、フェノール、およびエタノールなどが挙げられる。

【0030】変性物質の組み合わせは、代表的には、酵素を含有する組成と酵素を含有しない組成とに大別される。酵素を含有する組成の例として、リゾチームと、界面活性剤またはカオトロピック試薬との組み合わせが挙げられる（例えば、欧州特許公開第0061250号を参照）。酵素を含有しない組成の例として、界面活性剤と、カオトロピック試薬と、金属キレート剤と、還元剤との組み合わせが挙げられる（例えば、米国特許第5,212,059号を参照）。

【0031】上記の化学的処理の温度は、代表的には 0°C ～ 80°C 、好ましくは 5°C ～ 40°C 程度の範囲で設定

される。化学的処理の時間は、目的とする遺伝子の抽出が達成される限り、特に限定されないが、代表的には3分間～30分間、好ましくは5分間～20分間程度の範囲で設定される。

【0032】当業者に明らかなように、測定対象物の種類によって、電気的処理または化学的処理の条件を最適化することが望ましい。例えば、グラム陰性細菌を処理する場合、通常、グラム陽性細菌よりも厳しい処理条件が必要とされることが多い。ウイルスを処理する場合、通常、細菌全般よりも厳しい処理条件が必要とされることが多い。細胞壁を有する植物および菌類などの細胞の場合、通常、それ以外の細胞および細菌の場合よりも厳しい処理条件が必要とされることが多い。このような処理条件の最適化は、当業者には容易である。

【0033】遺伝子の抽出工程はまた、上記電気的処理または化学的処理と併せて、またはこれらの処理の代わりに、測定対象物を物理的処理（例えば、超音波処理または加熱など）に付すことによっても達成され得る。

【0034】（断片化工程）本発明において、抽出された遺伝子は、必要に応じてさらに「断片化」される。断片化とは、遺伝子の分子サイズを小さくすることをいう。遺伝子を断片化することにより、後の検出工程での感度および特異性を向上させることが可能である。断片化の度合いは特に限定されないが、処理後の断片が、代表的には20～2000塩基対、好ましくは50～1000塩基対、より好ましくは100～500塩基対程度の範囲の平均サイズとなるように処理条件が設定されることが望ましい。断片化の工程には、核酸のリン酸エステル結合を切断し得る任意の条件を用い得、代表的には、抽出された遺伝子を制限酵素処理、または酸もしくはアルカリでの化学的処理に付すことで達成され得る。切断部位の選択性が高い点で、制限酵素処理が好ましい。多種類の制限酵素が入手可能であり、目的遺伝子の塩基配列に基づいて、検出工程において認識される当該遺伝子中の特定の領域（例えば、相補的ポリヌクレオチドがハイブリダイズする領域）を挟んで所望のサイズの断片が生じるように、適切な制限酵素の組み合わせを選択することができる。

【0035】もっとも、目的遺伝子の種類、または意図される検出の性質などによっては、遺伝子を断片化することなく、直ちに検出工程に付し、遺伝子の存在について判別できる場合がある。このような場合、簡便さの観点から、断片化工程を省略すること選択され得る。また、上記抽出工程において、例えば電気的処理の結果、目的遺伝子の少なくとも一部が、ある程度まで断片化されることも可能であり、そのような態様もまた、本発明に含まれる。

【0036】（検出工程）本発明において、抽出された遺伝子またはその断片が有する塩基配列中の特定の領域を特異的に認識する結合リガンドを利用することによ

り、目的遺伝子またはその断片（以下、単に「検出対象遺伝子」ともいう）が検出される。結合リガンドとして、代表的には、検出対象遺伝子を抗原として認識して結合する抗遺伝子抗体（すなわち、抗DNA抗体）、ならびに、検出対象遺伝子の一部の塩基配列と相補的な塩基配列を有する相補的ポリヌクレオチドを用い得る。

【0037】本明細書において、「検出」とは、目的遺伝子の存在する可能性の有無を判別することをいう。この検出は、好ましくは目的遺伝子について選択的であるが、必ずしも常に選択的である必要はなく、例えば、目的遺伝子が存在しない試料グループと、存在する可能性がある試料グループとの区別を可能にする検出方法も、本発明の態様に含まれ得る。この場合、第2の試料グループについて、より選択性の高いさらなる検出方法を適用することにより、より高い信頼性で、目的遺伝子の存在について判断することが可能になる。

【0038】抗遺伝子抗体による、検出対象遺伝子への結合反応は、具体的には、免疫クロマトグラフィー法、免疫比濁法、免疫ひろう法、ラテックス免疫比濁法、ラテックス免疫ひろう法または蛍光偏光免疫測定法を用いて検出され得る。特に、免疫クロマトグラフィー法が好ましい。

【0039】ここで、免疫クロマトグラフィー法とは、固相（すなわち、本発明の装置中の試料泳動体）上に固定化された抗遺伝子抗体によって検出対象遺伝子を捕捉し、捕捉された検出対象遺伝子の存在を発色、蛍光などによって可視化する検出方法をいう。結合リガンドとしての抗遺伝子抗体は、下記の相補的ポリヌクレオチドと比べて、検出対象遺伝子に対する親和性が一般に高く、より迅速な検出を可能にする点で好ましい。検出対象遺伝子の可視化は、代表的には、検出対象遺伝子に結合し得、かつ標識部分を有する別の結合リガンド（以下「標識リガンド」ともいう）を結合させることによって行われる。標識リガンドは、代表的には、抗遺伝子抗体または相補的ポリヌクレオチドである。標識された相補的ポリヌクレオチドを用いることは、同じ検出対象遺伝子に対する抗遺伝子抗体との結合に干渉する可能性が少ない点で有利であり得る。標識部分は、金属粒子、酵素、蛍光性錯体など、その存在が可視化され得る任意の構造を含む。

【0040】上記のように、免疫クロマトグラフィー法では、1つの検出対象遺伝子と結合し得る2つの抗遺伝子抗体が利用される場合、一方は固定化され、他方は遊離の状態を提供され得る。このとき、2つの抗遺伝子抗体は同一の抗体であっても良く、異なる抗体であっても良い。2つの異なる抗遺伝子抗体を用いる場合、通常、少なくとも一方は検出対象遺伝子と特異的に結合し得、好ましくは、両方が検出対象遺伝子とそれぞれ特異的に結合し得る。下記の免疫比濁法などにおいても、複合体を効率よく析出させるために、例えば、単一の粒子状担

体に2つの異なる抗遺伝子抗体を共有結合させることができる。

【0041】免疫クロマトグラフィー法ではまた、1つの検出対象遺伝子と結合し得る、固定化された1つの抗遺伝子抗体と、遊離の状態の1つの相補的ポリヌクレオチドとが利用され得る。このとき、通常、少なくとも一方は検出対象遺伝子と特異的に結合し得る、好ましくは、両方が検出対象遺伝子とそれぞれ特異的に結合し得る。下記の免疫比濁法などにおいても、複合体を効率よく析出させるために、例えば、単一の粒子状担体に1つの抗遺伝子抗体と1つの相補的ポリヌクレオチドとを共有結合させることができる。

【0042】免疫クロマトグラフィー法の場合とは異なり、抗遺伝子抗体を他の検出方法に用いる場合、通常、抗遺伝子抗体を試料泳動体上に固定することは必要でない。試料泳動体上の、目的遺伝子またはその断片（すなわち「検出対象遺伝子」）を検出するための領域に、抗遺伝子抗体と検出対象遺伝子との複合体が、検出のために十分な時間存在（滞留）し得ればよい。

【0043】免疫比濁法とは、抗遺伝子抗体と検出対象遺伝子とが結合することによって試料液に溶解しない複合体を析出させ、試料泳動体上の、析出した複合体が存在する領域に光を入射させ、透過する光の強さを測定することで当該複合体の存在を検出する方法をいう。免疫ひろう法とは、免疫比濁法と同様に抗遺伝子抗体と検出対象遺伝子との複合体を析出させ、試料泳動体上の、析出した複合体が存在する領域に光を入射させ、析出物による散乱光の強さを入射光と異なる一定角度の横行から測定することで当該複合体の存在を検出する方法をいう。

【0044】免疫比濁法および免疫ひろう法のために、検出対象遺伝子を不溶性の複合体とするための構成の例として、抗遺伝子抗体の架橋、抗遺伝子抗体の粒子状担体への共有結合などが挙げられる。特に粒子状担体としてラテックス粒子を用いる場合の免疫比濁法および免疫ひろう法を、それぞれ、ラテックス免疫比濁法およびラテックス免疫ひろう法という。上記のように、免疫比濁法および免疫ひろう法においては、検出領域に抗遺伝子抗体が固定化される必要はない。ただし、検出対象遺伝子を含む複合体が検出領域から容易に流出しないことが望まれるので、検出対象遺伝子に比べて複合体の分子量が著しく大きくなるように、結合リガンドを設計することが好ましい。

【0045】蛍光偏光免疫測定法とは、蛍光性化合物を直線偏光によって励起した場合に化合物から放出される蛍光がその分子量に比例した大きさの偏光度を有する原理に基づいて、蛍光標識した抗遺伝子抗体と検出対象遺伝子との結合を、蛍光性分子の分子量変化として検出する方法をいう。この原理から明らかなように、蛍光偏光免疫測定法においても、検出対象遺伝子に比べて複合体

の分子量が著しく大きくなるように、結合リガンドを設計することが好ましい。

【0046】相補的ポリヌクレオチドによる、目的遺伝子またはその断片とのハイブリダイゼーションは、具体的には、遺伝子クロマトグラフィー法、または遺伝子比濁法を用いて検出され得る。特に、遺伝子クロマトグラフィー法が好ましい。

【0047】ここで、遺伝子クロマトグラフィー法とは、固相（すなわち、本発明の装置中の試料泳動体）上に固定化された相補的ポリヌクレオチドによって検出対象遺伝子を捕捉し、捕捉された検出対象遺伝子の存在を発色、蛍光などによって可視化する検出方法をいう。結合リガンドとしての相補的ポリヌクレオチドは、抗遺伝子抗体と比べて、検出対象遺伝子に対する結合の特異性が一般に高く、より選択的な検出を可能にする点で好ましい。検出対象遺伝子の可視化は、代表的には、検出対象遺伝子に結合し得、かつ標識部分を有する標識リガンドを結合させることによって行われる。標識リガンドは、好ましくは、相補的ポリヌクレオチドである。標識部分は、免疫クロマトグラフィー法の場合と同様に、任意の可視化され得る構造を含む。

【0048】上記のように、免疫クロマトグラフィー法では、1つの検出対象遺伝子と結合し得る2つの相補的ポリヌクレオチドが利用され得、一方は固定化され、他方は遊離の状態で提供され得る。このとき、2つの相補的ポリヌクレオチドは同一の配列を有しても良く、異なる配列を有しても良い。2つの異なる配列を利用する場合、通常、少なくとも一方は検出対象遺伝子と特異的にハイブリダイズし得る配列であり、好ましくは、両方が検出対象遺伝子とそれぞれ特異的にハイブリダイズし得る配列である。下記の遺伝子比濁法などにおいても、複合体を効率よく析出させるために、例えば、単一の粒子状担体に2つの異なる相補的ポリヌクレオチドを共有結合させることができる。

【0049】遺伝子クロマトグラフィー法の場合とは異なり、相補的ポリヌクレオチドを他の検出方法に用いる場合、通常、相補的ポリヌクレオチドを試料泳動体上に固定することは必要でない。試料泳動体上の、目的遺伝子またはその断片を検出するための領域に、相補的ポリヌクレオチドと検出対象遺伝子との複合体が存在（滞留）していれば十分である。

【0050】遺伝子比濁法は、相補的ポリヌクレオチドと検出対象遺伝子とが結合することによって試料液に溶解しない複合体を析出させる以外は、免疫比濁法と同様に行われる検出方法である。遺伝子比ろう法は、遺伝子比濁法と同様に相補的ポリヌクレオチドと検出対象遺伝子との複合体を析出させる以外は、免疫比ろう法と同様に行われる検出方法である。上記のように、これらの方法において、複合体を効率よく析出させるために、例えば、単一の粒子状担体に1つの相補的ポリヌクレオチド

と1つの抗遺伝子抗体とを共有結合させることができる。この場合、遺伝子比濁法と免疫比濁法、および遺伝子ひろう法と免疫ひろう法とは、それぞれ重複した概念を意味し得る。

【0051】（遺伝子検出方法のための装置）本発明による遺伝子検出装置の構成の例を、以下に、図1を参照して説明する。本検出装置は、支持体（3）上にそれぞれ配置された、泳動判定部（1）、ならびに、吸水部（4）、遺伝子抽出部（5）、遺伝子切断部（6）および標識リガンド含有部（7）から構成され得る。泳動判定部上の一部に、遺伝子を検出するための結合リガンドが固定化または保持された領域（2）が形成される（この領域は、必要に応じて「検出領域」とも呼ばれる）。泳動判定部、吸水部、遺伝子抽出部、遺伝子切断部および標識リガンド含有部の一体化された組み合わせが「試料泳動体」に該当する。

【0052】本発明において、吸水部（4）および遺伝子切断部（6）は、それぞれ省略可能な任意の構成部分である。以下の検出装置の記述は、あくまで例示であり、本発明の作用効果が達成され得る限り、その形状、材質、配置などの変更を含めて、当業者に容易な任意の変更がなされ得ることが理解される。

【0053】支持体（3）は、試料泳動体を物理的に支持する機能を果たす任意の形状および材料で構成される。例えば、ポリビニル板などが利用され得るが、これらに限定されない。当業者に明らかのように、遺伝子の検出が比濁分析に基づいて行われる場合、支持体の少なくとも検出領域を支持する部分は、光を透過し得る透明または半透明の材料であることが求められる。

【0054】遺伝子抽出部（5）は、細胞、ウイルスまたは細菌を含む液体試料が導入される部分であり、本発明における抽出領域を規定する。この部分は、導入された試料を吸収し、保持し、徐々に、隣接する遺伝子切断部（6）へと通過させる性質の多孔質担体（例えば、ガラス繊維ろ紙など）で構成される。遺伝子抽出部は、所望の抽出処理、代表的には電気的処理または化学的処理を行うための構成を有する。電気的処理のためには、通常、遺伝子抽出部を挟んで一对の電極の面を接触させ得る形状であればよい。化学的処理のためには、通常、必要な変性試薬を遺伝子の抽出のために十分な量で、あらかじめ遺伝子抽出部に保持させておく。

【0055】遺伝子切断部（6）は、本発明における任意の断片化領域を規定する。この部分は、遺伝子抽出部から移動した試料を吸収し、保持し、徐々に、隣接する標識リガンド含有部（7）へと通過させる性質の多孔質担体（例えば、ガラス繊維ろ紙など）で構成される。遺伝子切断部は、所望の断片化処理、代表的には制限酵素処理または化学的処理を行うための構成を有する。すなわち、通常、必要な制限酵素または酸もしくはアルカリを遺伝子の断片化のために十分な量で、あらかじめ遺伝

子切断部に保持させておく。

【0056】標識リガンド含有部(7)は、本発明における検出領域中のサブ領域の1つを規定する。この部分は、遺伝子切断部から移動した試料を吸収し、保持し、徐々に、隣接する泳動判定部(1)へと通過させる性質の多孔質担体(例えば、ガラス繊維ろ紙など)で構成される。標識リガンド含有部には、所望の標識リガンド、代表的には、標識部分を有する抗遺伝子抗体または相補的ポリヌクレオチドを、あらかじめ保持させておく。検出対象遺伝子に結合し得、かつその結合が同じ遺伝子と下記の捕捉リガンドとの結合を妨げない限り、任意の標識リガンドを用い得る。例えば、標識抗体または標識ポリヌクレオチドを含む水溶液を多孔質担体に含浸させた後、凍結乾燥させることにより、これらの抗体またはポリヌクレオチドを均一に担持させ得る。

【0057】吸水部(4)は、過剰の試料を吸収し得るように、十分な吸水力および給水容量を有する多孔質担体(例えば、ガラス繊維ろ紙)から構成される。下記の理由から、遺伝子の検出が、免疫クロマトグラフィー法または遺伝子クロマトグラフィー法によって行われる場合、吸水部が設けられることが好ましい。吸水部、ならびに、上記の遺伝子抽出部(5)、遺伝子切断部(6)および標識リガンド含有部(7)としては、同一の多孔質担体を用いてもよく、あるいは、それぞれの部分が所望の速度で試料を移動させ得るように、異なる多孔質担体、例えば、同じ材料で多孔度の異なる材料を用いてもよい。多孔質担体の材料としては、ガラス繊維ろ紙の他に、セルロース、ニトロセルロースなどを用い得る。

【0058】泳動判定部(1)は、本発明における検出領域中のサブ領域の別の1つを規定する。この部分は、液体試料を通過させる性質の多孔質担体で構成される。検出対象遺伝子に対する非特異的な吸着を実質的に示すことがなく、かつ液体試料の適切な速度での移動を可能にする限り、任意の多孔質担体を用い得る。多孔質担体の例としては、ニトロセルロース、セルロース、ガラス繊維ろ紙、スチロール樹脂、ビニル系樹脂などが挙げられる。多孔質担体の水に対する親和性が低い場合は界面活性剤を用いてもよい。泳動判定部の形状は特に限定されないが、図1に示すように、シート状に形成されていることが好ましい。

【0059】遺伝子の検出が、免疫クロマトグラフィー法または遺伝子クロマトグラフィー法によって行われる場合、遺伝子を検出するための結合リガンド(代表的には、抗遺伝子抗体または相補的ポリヌクレオチド)は泳動判定部上の検出領域(2)の領域に固定されている

(検出領域上にある結合リガンドは「捕捉リガンド」とも呼ばれる)。固定化の強度は、液体試料の移動に伴う位置の変化が実質的に起きない強度であればよい。この場合、ニトロセルロースは、抗体およびDNAを固定しやすい点で有利に用いられる多孔質担体である。抗遺伝

子抗体または相補的ポリヌクレオチドは、検出領域を形成する任意の領域に水溶液として滴下した後、乾燥および洗浄することにより固定化することができる。遺伝子の検出を行う際には、液体試料は検出領域を完全に通過させることで、細胞、ウイルスまたは細菌に由来する、検出対象遺伝子以外の易移動性の成分を検出領域から洗い流すことができる。従って、液体試料が検出領域を完全に通過した後で、検出操作を行うことが好ましい。また、検出装置は、吸水部を有することが好ましい。

【0060】遺伝子の検出が、免疫クロマトグラフィー法および遺伝子クロマトグラフィー法以外の、比濁法またはひろう法などに基づいて行われる場合、抗遺伝子抗体または相補的ポリヌクレオチドは多孔質担体上に固定されている必要はなく、検出領域(2)の領域内から容易には脱落しないように保持されていればよい。この場合、多孔質担体として、例えば、ガラス繊維ろ紙、不織布などを用い得る。遺伝子の検出を行う際には、液体試料が検出領域を完全に通過してしまうと、結合リガンドと検出対象遺伝子との複合体が検出領域から流出してしまう。従って、十分な量の液体試料が検出領域に到達した時点で、検出操作を行うことが好ましい。また、検出装置には、吸水部は必ずしも必要ではない。

【0061】標識リガンドおよび/または捕捉リガンドとして用いられる抗遺伝子抗体は、検出対象遺伝子を認識して抗原-抗体反応し得る限り、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、キメラ抗体、Fab抗体、(Fab)₂抗体などの形態でもあり得る。抗体のクラスは特に限定されないが、好ましくは、IgGである。当業者は、検出対象遺伝子に対応して適切な抗体を選択し得る。一定の遺伝子に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体などは、当該分野で公知であり、容易に入手し得る。抗遺伝子抗体はまた、当該分野で公知の免疫学的方法などに従って作製し得る。

【0062】標識リガンドおよび/または捕捉リガンドとして用いられる相補的ポリヌクレオチドは、通常一本鎖DNAであるが、検出対象遺伝子を認識してハイブリダイゼーションし得る限り、他の任意の形態のポリヌクレオチド分子であり得る。例えば、DNAのリン酸結合をより安定なイミデート結合に変更した改変DNAなどを用い得る。当業者は、検出対象遺伝子に対応して適切なポリヌクレオチドを選択し得る。一定の遺伝子に結合するDNAプローブなどは、当該分野で公知であり、容易に入手し得る。相補的ポリヌクレオチドはまた、当該分野で公知のヌクレオチド合成法などに従って作製し得る。

【0063】遺伝子抽出部(5)、遺伝子切断部(6)および標識リガンド含有部(7)は、代表的には、別々に用意されて、泳動判定部(1)と組み合わせて、支持体(3)上で互いに接触するように配置され得る。図1

に示すような、遺伝子抽出部、遺伝子切断部および標識リガンド含有部を支持体上に直接配置した構成の他に、例えば、これら遺伝子抽出部、遺伝子切断部および標識リガンド含有部の一部または全部が、泳動判定部上に置かれた構成も可能である。このような構成の変更は、例えば遺伝子切断部における制限酵素の保持量（含浸量）など、種々の要因を考慮して、適宜設定し得る。さらに、一つの多孔質担体を、遺伝子抽出部、遺伝子切断部および標識リガンド含有部のうち、いずれか2つ、または3つ全てとして利用することも可能である。この場合、一つの多孔質担体の異なる部位が、遺伝子抽出部、遺伝子切断部および標識リガンド含有部のうちの所望の機能を果たすように、処置される。

【0064】以上の各部分（5、6および7）を、吸水部（4）、および泳動判定部（1）とともに、支持体（3）上に配置して、一体となった検出装置を構成する。各部分は、例えば、両面テープを用いて、支持体（3）に貼り付けられ得る。代わりに、一つの多孔質担体を、遺伝子抽出部、遺伝子切断部、標識リガンド含有部、および吸水部、ならびに泳動判定部の全ての機能を果たす、一体化された試料泳動体として利用することも可能である。図1に示すように、吸水部が試料泳動体の下流側を、遺伝子抽出部が試料泳動体の上流側を規定する。

【0065】測定対象物を含む液体試料は、以上のように構成された検出装置の遺伝子抽出部に添加されると、固液界面でのキャピラリー作用によって、下流側に向かって装置の各部分を通過する。その間に、上記の抽出、断片化、および検出の各工程が達成される。各工程を効率良く行うためには、液体試料の移動速度を最適化することが所望される。

【0066】移動速度は、試料泳動体の各部分の多孔質担体の選択によって制御され得る。例えば、周知のように、ガラス繊維ろ紙はニトロセルロースに比べて一般に移動速度が大きい。移動速度はまた、液体試料の媒体の組成の選択によって制御され得る。例えば、液体試料の粘度を高くすることによって、一般に移動速度は低下する。液体試料の粘度を調節するために、上記の抽出、断片化、および検出の各工程での作用を妨げない限り、任意の粘度調節剤、例えば、スクロースなどの糖類などを使用し得る。移動速度はまた、検出装置の各部分の境界面に移動障壁を設けることによって制御され得る。例えば、遺伝子抽出部と遺伝子切断部との境界面に、ポリビニルアルコールのようなポリマーを含浸させることによって、遺伝子抽出部における液体試料の滞留時間を延長させることができる。移動速度を適切に制御するために、上記のまたは他の公知の技術を利用し得る。

【0067】本発明によれば、細胞、ウイルスまたは細菌を含む試料から、抽出され、かつ任意に断片化された検出対象遺伝子が検出される。抽出、断片化、および検

出の各工程が単一の検出装置上で行われるため、操作上の制約の少ない、簡便な検出が可能になる。検出対象遺伝子は、代表的には、標識リガンドおよび捕捉リガンドと複合体を形成した状態で検出される。特に、捕捉リガンドとして抗遺伝子抗体または相補的ポリヌクレオチドを用いることにより、選択性の高い検出が可能になる。

【0068】

【実施例】以下、本発明を、実施例によって具体的に説明する。本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

【0069】（実施例1：相補的ポリヌクレオチド捕捉型の装置によるサルモネラ菌の検出）

1. 1 クロマトグラフィー装置の作製

約5cm×約0.9cmのニトロセルロース膜（ミリボ社製）の、短辺の端から1cmの上に、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子（サイズ：275bp）に対する第1プローブ（配列：TTGTCACCG）0.1mg/mlを含有するPBS溶液約10μlを、ニトロセルロース膜の長辺に対して垂直方向に端から端まで幅約1mmのライン状に滴下し、その後、40℃で20分間遮光状態で乾燥することにより、サルモネラ遺伝子プローブを固定化した。得られた固定化ニトロセルロース膜を、1%スキムミルクを含有する0.1Mトリス溶液（pH8.2）に、30℃で30分間浸すことにより、ブロッキングした。ブロッキング後、ニトロセルロース膜を、0.1Mトリス溶液（pH8.2）で2回洗浄し、40℃で4時間乾燥させた。乾燥後の固定化ニトロセルロース膜を用いて、以下のようにクロマトグラフィー装置を作製した。

【0070】約10cm×約0.9cmのポリビニル板の支持体を、裏打ち材として用意した。この支持体の上面に、上記のサルモネラ遺伝子プローブ固定化ニトロセルロース膜を、両面テープを用いて接着した。このニトロセルロース膜の一方の端（下流側）に、吸水部として、約2cm×約0.9cmのガラス繊維片を接着した。ニトロセルロース膜の他端（上流側）に、下流側に向かって、遺伝子抽出部、遺伝子切断部および標識リガンド含有部として、それぞれ、約1cm×約0.9cm、約1cm×約0.9cmおよび約1cm×約0.9cmのガラス繊維片（厚さ約0.1cm）を、順次接着した（図1）。ガラス繊維片の接着にも、両面テープを用いた。

【0071】以上のようにクロマトグラフィー装置を組み立てた後、遺伝子切断部であるガラス繊維片に、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子を切り出す制限酵素である *HindIII* および *EcoRI* を、サルモネラ菌含有試料に対して大過剰となるように、PBS溶液として含浸させた。

【0072】また、標識リガンド含有部であるガラス繊維片には、金コロイド標識したサルモネラ菌 *invA* 遺

伝子に対する第2プローブ（配列：TGGTCCAGTT）5mg/mlを含有するPBS溶液約100 μ lを含浸させた。

【0073】1. 2 サルモネラ菌含有試料からの遺伝子検出

サルモネラ菌（*S. typhimurium*） $10^5 \sim 10^9$ 細胞/mlの範囲の各種濃度でPBS中に含む溶液を用意し、サルモネラ菌含有試料として用いた。各1mlの試料を、上記クロマトグラフィー装置の遺伝子抽出部に添加した。添加後、遺伝子抽出部の上面と、対向する裏打ち材の裏面とに、それぞれ約0.2cm \times 約0.9cmの電極の面を接触させ、20Vの直流電圧を10分間かけた。細菌が破壊され、遊離した遺伝子が電極表面付近に付着した。

【0074】遊離した遺伝子を含む試料は、遺伝子抽出部から、隣接する遺伝子切断部に移動することが観察された。遺伝子切断部では、あらかじめ添加された制限酵素（HindIIIおよびEcoRI）の作用により、遺伝子が断片化された。試料が遺伝子切断部から、隣接する標識リガンド含有部に移動するのに、約10分間を要した。

【0075】試料がさらに、標識リガンド含有部の下流側の端から、ニトロセルロース膜上の、サルモネラ遺伝子プローブを固定化したラインまで移動するのに、約5分間を要した。ライン上に、金コロイドに由来する赤色が現れ、サルモネラ菌を検出できた。結果を、図2に示す。図2の吸光度（O.D.）は、試料を最初にクロマトグラフィー装置に添加してから25分後に、反射吸光度測定器（島津製作所製CS9300）により、入射光に対するニトロセルロース膜表面の反射光の強度を、遺伝子プローブが固定化されたライン部の面積当たりの積算強度として、測定したものである。ブランクは、未使用のニトロセルロース膜表面とした。

【0076】（実施例2：抗遺伝子抗体捕捉型の装置によるサルモネラ菌の検出）

2. 1 クロマトグラフィー装置の作製

本実施例では、実施例1におけるサルモネラ菌invA遺伝子プローブ（配列：TTGTCCACCG）の代わりに、同じサルモネラ菌invA遺伝子に対するモノクローナル抗体を用いた。具体的には、モノクローナル抗体1.0mg/mlを含有するPBS溶液約100 μ lを、遺伝子プローブの場合と同様にしてニトロセルロース膜上にライン状に滴下し、乾燥、固定化、ブロッキング、洗浄および乾燥を行った。この固定化ニトロセルロース膜を用いて、実施例1と同様にして、クロマトグラフィー装置を作製した。

【0077】遺伝子切断部および標識リガンド含有部であるガラス繊維片には、実施例1と同様に、それぞれ、大過剰のHindIIIおよびEcoRIと、金コロイ

ド標識したサルモネラ菌invA遺伝子プローブ（配列：TGGTCCAGTT）とを含浸させた。従って、本実施例によれば、サルモネラ菌invA遺伝子の制限酵素断片が、移動相の標識遺伝子プローブと、固定相のモノクローナル抗体とにサンドイッチされて検出可能な複合体を形成する。

【0078】2. 2 サルモネラ菌含有試料からの遺伝子検出

実施例1と同様のサルモネラ菌含有試料各1mlを、上記クロマトグラフィー装置の遺伝子抽出部に添加した。添加後、実施例1と同様に、遺伝子抽出部に20Vの直流電圧を荷電した（10分間）。遊離した遺伝子を含む試料は、遺伝子抽出部から、遺伝子切断部に移動し、その後、約10分間を要して、遺伝子切断部から、隣接する標識リガンド含有部に移動した。試料がさらに、標識リガンド含有部の下流側の端から、ニトロセルロース膜上の、モノクローナル抗体を固定化したラインまで移動するのに、約5分間を要した。ライン上に、金コロイドに由来する赤色が現れ、サルモネラ菌を検出できた。結果を、図3に示す。吸光度（O.D.）の測定条件も、実施例1と同様である。

【0079】

【発明の効果】本発明は、細胞、ウイルスまたは細菌からの遺伝子の抽出、必要に応じた抽出遺伝子の断片化、および遺伝子またはその断片の検出が、一体化された検出装置上での液体試料の移動によって、連続的に行い得る遺伝子検出装置を提供する。本発明によれば、細胞、ウイルスまたは細菌を簡便に、かつ高い選択性をもって検出し得るので、環境、食品および医療などの分野における分析に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による遺伝子検出装置の構成例の概略を示す図である。

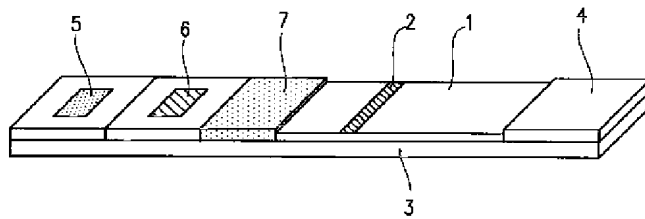
【図2】 本発明の検出装置を用い、相補的ポリヌクレオチドを備えた免疫クロマトグラフィー法を利用して、サルモネラ菌を検出した結果を示すグラフである。

【図3】 本発明の検出装置を用い、抗遺伝子抗体および相補的ポリヌクレオチドを備えた遺伝子クロマトグラフィー法を利用して、サルモネラ菌を検出した結果を示すグラフである。

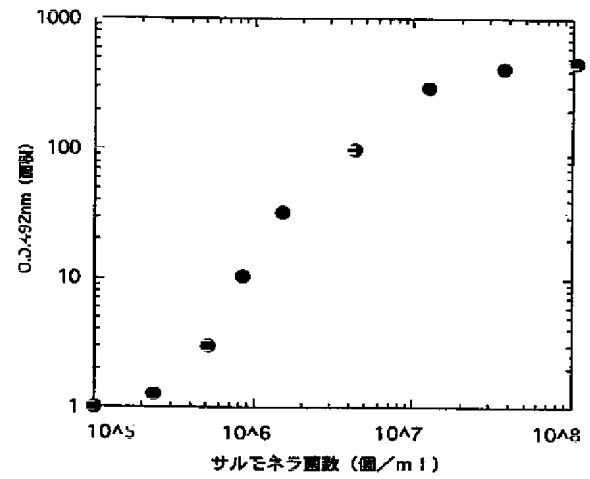
【符号の説明】

- 1 泳動判定部
- 2 検出領域
- 3 支持体
- 4 吸水部
- 5 遺伝子抽出部
- 6 遺伝子切断部
- 7 標識リガンド含有部

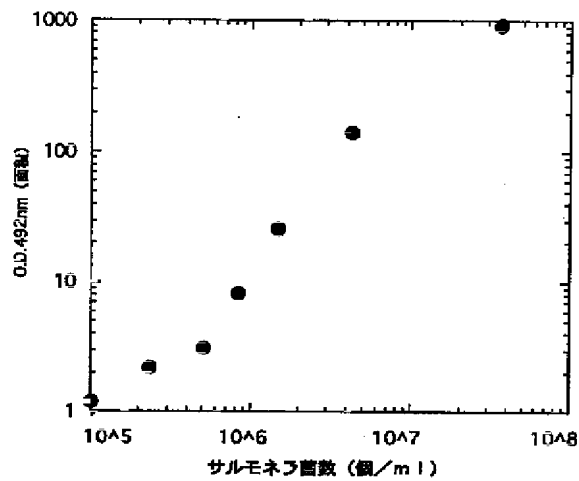
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/566

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

(参考)

A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA11 AA14 AA17
CA01 CA09 DA03 DA05 HA09
HA11 HA14
4B029 AA07 BB02 BB11 BB13 FA03
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06
QQ08 QQ10 QQ15 QQ16 QQ18
QQ19 QQ42 QR14 QR16 QR32
QR41 QR48 QR51 QR54 QR55
QR64 QR84 QS14 QS17 QS34
QS39 QX01